Contribuição para o estudo da biolojia dos Culicideos.

Observações sobre a respiração nas larvas.

pelo

DR. A. DA COSTA LIMA.

(Com a estampa 4 e 2 fig. no texto).

Contributions to the biology of the Culicidae.

Observations on the respiratory process of the larvae

by

DR. A. DA COSTA LIMA.

(With plate 4 and 2 figures in the text.)

Tratando da questão da respiração nas larvas de culicideos todos os autores afirmam que elas respiram exclusivamente o ar livre e que por isso são obrigadas a vir constantemente á tona d'agua, afim de inalal-o através das aberturas dos dois troncos traqueais. Como consequencia immediata desta afirmação dizem todos que a larva de qualquer culicideo perecerá asfixiada, quando não puder inalar o ar livre.

Basendo-nos em observações e em experiencias pessoais relativas a esta questão, vamos expor, nas linhas que se seguem, os resultados que obtivemos.

Antes de tudo, devemos considerar o fato, que aliás já tem sido assinalado pelos autores, das larvas pertencentes a certas fa-

Speaking of the respiration in mosquito larvae all the authors declare that it is strictly aerial and foı this reason they must constantly return to the surface of the wateı in order to inhale air by the orifices of the tracheal trunks. It follows, that in their opinion any culicid larva will die asphyxiated if prevented to absorb the free air. Having made some observations and experiments on this question I shall give the results in this paper.

In first line we must remember the observations formerly made by different students and showing that the larvae of some *culicidae*, principally *Dendromyinae* and especially *Limatus Durhami*, may stay a long time without coming to the surface to breathe.

milias de culicideos, principalmente das de *Dendromyinae* de *Limatus Durhami*, passarem muito tempo sem vir á tona d'agua para respirar.

Empregando em nossas experiencias larvas de *Limatus* observámos que, ás vezes, elas passam uma hora, ou mesmo um lapso de tempo mais longo, sem vir á tona d'agua para respirar. Em Santarém (*) observámos uma larva de *Limatus*, já bem desenvolvida, que ficou sem vir á tona d'agua durante 53 minutos. Em outra ocasião, observámos outra larva de *Limatus*, de tamanho medio, que se manteve sem vir á tona d'agua durante 1 hora e 35 minutos; quando começámos a observar esta larva, ela já se achava sobre o fundo do bocal.

Observando-se um lote de larvas de *Limatus* em bocal de vidro, verifica-se geralmente o seguinte: nos primeiros dias, quando as larvas ainda estão pequenas ou de tamanho medio, elas ficam durante muito tempo no fundo do bocal, ora deitadas sobre a camada de limo aí depositada, sem quasi se mover, ora movendo-se dum para outro ponto á procura de alimento. Mais tarde, quando as larvas ficam mais desenvolvidas, elas vêm mais frequentemente á tona d'agua para respirar o ar livre.

As larvas de *Limatus* mantêm-se assim sem respirar o ar, não porque possuam capacidade grande de absorver ar e sim *porque respiram o ar dissolvido nagua*. Chegámos a esta conclusão, em primeiro lugar porque, examinando bem os dois troncos traqueais da larva, nada vimos de extraordinario, quanto á fórma que eles apresentam, comparando-os com os mesmos troncos traqueais de larvas de outras especies que, normalmente, pouco tempo se demoram no fundo dagua.

Por outro lado, examinando os foliolos branquiais da larva, observámos uma estrutura que indica claramente que tais organs desempenham algum papel na função respiratoria. O foliolo branquial da larva de *Limatus* é obovoide, isto é, apresenta-se com a extremidade dilatada e arredondada; é ele percorrido na parte mediana por um ramo traqueal. Este ramo, em seu trajeto, emite varias ramificações, as quais, por sua vez, se dividem em ramusculos finissimos, uns acen-

(*) Foi nesta cidade que iniciámos o estudo desta questão, em Junho de 1912.

Observing larvae of *Limatus*, I noticed that they may stay an hour or more without coming to the surface. In Santarém (*) I noticed a well developped larve of *Limatus*, which did not come to the surface for 53 minutes. On another occasion I observed a halfgrown *Limatus* larva, which did not seek the surface for 1 hour and 35 minutes, having already stayed near the bottom when I began to watch it.

Keeping a lot of *Limatus* larvae in a glass-jar we may observe that during the first days, when they are still small or halfgrown, they will stay for long periods near the bottom, sometimes stretched out on the mud and hardly moving, at other times moving around in quest of food. Later on, when more developped, they will come to the surface more frequently, in order to breathe the free air.

The *Limatus* larva do not stay without breathing free air during so long periods because they are able to take in a great quantity, but *because they use the air dissolved in the water for their respiration*. I first came to this conclusion because, in comparing the form of the tracheal trunks with that of other larvae which normally stay only a short time at the bottom, I failed to notice anything special in their appearance.

On the other hand while examining the branquial leaflets of the larva I noticed a structure pointing distinctly to a special use of these organs for respiratory purposes. These leaflets are oboval having the free end enlarged and rounded: the tracheal tube in its axis branches several times and the finest ramifications of these branches run forwards or backwards and end in a granular layer which revests the leaflet, while the central branch generally terminates in a loop. In the peripheric granular stratum we find at various distances spherical bodies more finely and

(*) It was here that I began my observations in June 1912.

dentes, outros decendentes, que vão terminar todos numa camada granulosa que forra a periferia do foliolo. O ramo central termina geralmente formando alça.

Na camada periferica granulosa ha, mais ou menos distantes umas das outras, esferas constituidas por granulações mais finas e mais unidas tendo na parte central um ponto diferenciado das granulações que o rodeiam. (Est. 4, fig. 8) Para ficarmos cientes do papel desempenhado pelos foliolos branquiais, basta observar o modo por que se comporta uma larva de *Limatus* depois de feita a ablação deles.

Retirámos dum bocal, contendo larvas de *Limatus*, 2 larvas da mesma idade que habitualmente passavam muito tempo sem vir á superficie dagua; colocámos ambas noutro bocal de vidro, tendo em uma delas feito a ablação de 3 foliolos: verificámos que a larva com um foliolo passou a vir frequentemente á superficie, emquanto que a outra continuou no mesmo *modus vivendi*. Numa ocasião, durante todo o tempo em que a larva perfeita estava no fundo do bocal, a outra veiu 25 vezes á superficie dagua para respirar.

A camada granulosa contínua que se vê na periferia do foliolo não é mais que o protoplasma de celulas cujos nucleos são representados pelas esferas de granulações mais unidas. Essa camada é limitada exteriormente por uma cuticula regular e lisa e interiormente por uma membrana muito fina. Em certos pontos, os nucleos fazem hernia no interior do foliolo.

O aspeto da ramificação do tubo traqueal que percorre o centro do foliolo varia conforme a especie. Ha larvas em que as ramificações são abundantissimas (larvas de *Limatus*, de *Dendromyinae*; Est. 4 fig. 3 e 8) ha outras, em que as ramificações traqueais sem ser tão abundantes, ainda são notaveis (larvas de *Stegomyia* e de *Gualteria fluviatilis*) ha finalmente outras em que as ramificações são poucas ou quasi nulas (larvas de algumas culicinas e anofelinas). De modo geral, póde-se dizer que as larvas, cujos foliolos apresentam a extremidade romba, são ricas em ramificações traqueais, emquanto que as de extremidade ponteaguda são pobres dessas e que as larvas, cujos foliolos apresentam ramificaçõis traqueais abundantes, passam mais tempo sem vir á superficie dagua do que as que apresentam foliolos pobres em ramificações.

As larvas dos culicidios, em geral, respiram o ar livre por intermedio das 2 aberturas traqueais, localizadas na parte posterior do corpo, e *o ar dissolvido nagua, realizando-*

densely granulated and showing in the centre a point detaching itself from the surrounding granulations. (Plate 4, fig. 8). To learn the functions of the branchial leaflets we need only observe a *Limatus* larva deprived of them.

From a culture in a glass jar I took two *Limatus* larvae which used to pass a long time without coming to the surface and brought them in another vessel after removing three leaflets in one of them. I found now that the larva with only one leaflet used to come frequently to the surface while the other behaved as before. On one occasion while the normal larva remained at the bottom of the jar the other had come to the surface not less than 25 times.

The granular layer seen at the outside of the leaflet represents the protoplasm of cells and the round and more densely granulated bodies the nuclei. Periphericaily this layer is limited by an even and smooth cuticula and on the inside by a fine membrane on which the nuclei may bulge out.

The form of the tracheal tube running in the axis of the leaflet varies according to the species. There are some which show very abundant ramifications (*Limatus* and *Dendromyinae*; plate 4, fig. 3 and 8) while in others they are still conspicuous, though much less abundant (*Stegomyia* and *Gualteria fluviatilis*) and in still others they may be rare or altogether wanting, as in some culicinae and anophelinae. In a general way I find that the larvae with leaflets rounded at the end show plenty of ramifications while those with pointed ones have only a few; also the larvae with plenty of tracheal ramifications will stay much longer without coming to the surface than those with only a few.

The culicid larvae generally breathe free air by meens of the two tracheal openings located in the posterior part of the body and also air dissolved in water realizing the gaseous exchanges by means of the branquial leaflets and the general surface.

se as trocas gazozas ao nivel dos foliolos branquiais e principalmente ao nivel do tegumento.

Se por qualquer eventualidade a larva dum culicidio não puder respirar o ar exterior, ela não perecerá logo por asfixia, como até hoje se julgava; continuará viva durante muitas horas e mesmo dias, chegando, ás vezes, a se transformar em ninfa. Não conseguimos sempre obter os mesmos resultados, porquanto usámos larvas de especies diferentes e porque as primeiras experiencias apresentavam alguns defeitos de tecnica que corrijimos mais tarde. Comtudo, todas elas nos levaram áquela conclusão, relativamente á respiração nas larvas de culicideos.

Nas nossas primeiras experiencias, realizadas com o fim de verificar o tempo maximo que pode passar uma larva sem respirar o ar livre, empregavamos um pequeno frasco de vidro, com diametro de seção de 2 1/2 cent. e com 10 centimetros de altura: enchiamos esse frasco d'agua limpa e arejada, introduziamos nele de uma a 3 larvas e o fechavamos com rolha de vidro, de modo a não ficar bolha de ar. Com esse dispositivo as larvas, que mais tarde, com dispositivo mais aperfeiçoado, verificámos demorarem muitos dias privadas do ar exterior, morriam no fim de algumas horas. Citaremos algumas das primeiras experiencias e algumas das que foram praticadas com o emprego de frasco maior (de 500 gramas), o qual era fechado pelo mesmo processo.

Experiencias feitas com o vidro pequeno.

Emprego de agua limpa e arejada.

I. 22 de Outubro de 1912.
4 larvas de *Stegomyia* (2 grandes e 2 pequenas).
Vidro fechado ás 11 h. 18.
Larvas maiores ás 16 h. mortas.
Larvas menores ás 16 h. 45 mortas.

II. 23 de Outubro.
1 larva de *Stegomyia* bem desenvolvida.
Vidro fechado ás 9. 15.
Ainda viva ás 15 h. 33. Retirada do frasco e colocada num bocal de vidro aberto. Transformou-se em ninfa á 25, a qual deu mosquito a 27.

III. 23 de Outubro.
1 larva de *Stegomyia* bem desenvolvida.
Vidro fechado ás 16 h. e 40.

If by some reason a culicid larva is prevented from breathing the external air it must not die as generally supposed till now; it may go on living for many hours and even days sometimes reaching the nymphal state. I did not have the same results in all my experiences because they were made with various kind of larvae and in the beginning showed some technical defects which were corrected later on. Even so they all brought us to the conclusions just exposed.

In my first experiences on the question how long a larva may live without breathing free air I used a small glass bottle 10 cm. high and 2, 5 in diameter; it was filled with fresh and well ventilated water containing from one to three larvae and shut with a glass stopper avoiding air bubbles. In these conditions the larvae did at the end of a few hours also a better arrangement of the experience showed that they might stay for many days deprived of the exterior air. I shall record some of the first experiences and some others made while using a larger vessel of 500 c. cm., closed by the same process.

Experiences made in the small vessel.

(Using clean and aired water).

I. October 22, 1912.
4 Larvae of *Stegomyia* (2 large and 2 small ones)
Vessel closed at 11,18 a. m.
Larger larvae dead at 4 p. m.
Smaller larvae deaded at 4,45 p. m.

II. October 23rd.
1 larva of *Stegomyia* full grown.
Vessel closed at 9,15 a. m.
Still alive at 3,33 p. m. Removed from the vassel and transfered to an open jar. Reached to the pupa stage at 25th; imago hatched at 27th.

III. October 23.rd
1 larva of *Stegomyia* full grown.
Vessel closed at 4,40 p. m.

22 h. 40. entrou uma bolha de ar: larva perfeitamente viva.

IV. 14 de Novembro.

3 larvas de *Stegomyia* de tamanho medio.

Vidro fechado ás 18. h 30.

15—6 h. 2 vivas e 1 morta.

9. 30—Introduzimos uma pequena larva de *Stegomyia* sem os 4 foliolos branquiais.

10. 30—Introduzimos mais outra larva pequena de *Stegomyia* sem 3 dos foliolos anais.

14 h. —larva sem foliolos morta.

18 h. 30— Larva com 1 foliolo morta.

22 h. 30 2 larvas restantes vivas.

16 h. 7 —Todas mortas.

V. 16 de Novembro.

3 larvas de *Culex fatigans* (2 grandes e uma pequena).

Vidro fechado ás 11. h. 2.

12 h. mortas as 2 larvas grandes.

12. 39 introduzimos mais 1 larva pequena de *Stegomyia* e 1 grande.

14 h. morta a larva pequena de *Culex*.

16 h. morta a larva pequena de*Stegomyia*.

17 h. morta a larva grande de *Stegomyia*.

Experiencias feitas com o vidro grande. (Obidos).

(Emprego de agua relativamente limpa e arejada do rio Amazonas).

I. 19 de Novembro.

3 larvas de *Culex fatigans*, 3 de *Stegomyia*.

Vidro fechado ás 8. 5

12 h.—morta uma larva de *Culex*.

13 h.—morta outra larva de *Culex*.

2 h.—vivas 3 larvas de *Stegomyia* e uma de *Culex fatigans*.

20—A agua do frasco foi renovada por meio de 2 tubos de borracha: um para admissão de nova agua e outro para escoamento da agua do frasco. Por essa ocasião

10,40 p. m. A little bubble of air penetrated into the vessel; larva still alive.

IV. November 14th.

3 larvae of *Stegomyia* half grown.

Vessel closed at 9,30 p. m.

15th. 6 a. m. 2 alive and 1 dead.

9,30. A small larva of *Stegomyia* without anal flaps or leaflets was shut in the same vessel.

10,30. Another small Larva of *Stegomyia*, without 3 leaflets, was introduced.

2 p. m. Larva without leaflets dead.

6,30 p. m. Larva with 1 leaflet dead.

10,30 p. m. 2 remaining larvae alive.

16th. 7 a. m. Both dead.

V. November 16th.

3 larvae of *Culex fatigans* (2 large and 1 small one).

Vessel closed at 11,2 a. m.

12. m. 2 large larvae dead.

12,39 p. m. A small larvae of *Stegomyia* and a large one were introduced into the vessel.

3 p. m. Small larva of *Culex* dead.

4 p. m. Small larva of *Stegomyia* dead.

5 p. m. Large larve of *Stegomyia* dead.

Experiences made in the large vessel. (Obidos).

(Using relatively clean and aired water of Amazon river).

I. November 19th.

3 larvae of *Culex fatigans* and 3 of *Stegomyia*.

Jar closed at 8,5 a. m.

12. m. Larva of *Culex* dead.

1 p. m. Another larva of *Culex* dead.

10 p. m. 3 larvae of *Stegomyia* and 1 of *Culex fatigans* alive.

20th. The water of the jar was renewed by means of 2 rubber tubes, one for the introduction of new water and other for removing the jar water. During the changement of water I prevented the

evitámos que as larvas viessem á abertura do frasco.

21 – Renovámos a agua. Todas vivas.

22 h. examinando o frasco, encontrámos, por baixo da rolha de vidro, uma pequena bolha de ar. Retirámos a bolha. As 4 larvas foram transportadas para um bocal de vidro; a de *Culex* morreu alguns dias depois, as de *Stegomyia* deram ninfas a 23, as quais deram imajens a 25.

II. Novembro.

8 larvas de *Stegomyia* (4 sem foliolos e 4 com foliolos) e 2 ninfas,

Vidro fechado ás 12 h. 52

15 h. Mortas as 2 ninfas.

17 h. Morta uma das larvas sem foliolo.

Dia seguinte: 7 h. pareciam todas mortas; abrimos os vidros; transportámos todas as larvas para um bocal aberto com agua: deram logo sinais de vida.

12 h. moviam-se todas perfeitamente. Dias depois algumas morreram. Ficaram apenas 3 que deram ninfas a 23., as quais deram imajens a 25.

III. 23 de Novembro. *Agua recentemente fervida.* 1 larva de *Culex fatigans*, 1 de *Stegomyia* e 1 ninfa de *Stegomyia*.

Vidro fachado ás 7,50.

Ninfa morta ás 9,30.

Larva de *Culex* morta ás 10,30.

« « *Stegomyia* « « 12,15.

IV. 26 de Novembro.

2 larvas de *Stegomyia* de tamanho medio e 2 de *Limatus* do mesmo tamanho.

Vidro fechado ás 20 h. 15.

27 – 12 h. renovada a agua. Todas vivas.

28 – 22 h. Todas vivas.

29 – Examinando pela manhã o vidro, vimos uma bolha de ar. Larvas ainda todas vivas.

V. 20 de Dezembro.

Agua de chuva arejada.

larvae coming to the mouth of the jar.

21st. Water renewed. All larvae alive.

10 p. m. Saw a little air bubble under the glass cover; removed the stopper and transfered the 4 larvae to an open jar. The *Culex* larva died a few days afterwards the *Stegomyia* larvae pupated at 23rd. and the imagines hatched at 25th.

II. November.

8 larvae of *Stegomyia* (4 without and 4 with leaflets) and 2 pupae.

Jar closed at 12,52 p. m.

3 p. m. 2 pupae dead.

5 p. m. 1 larva without leaflets dead.

Next day: 7 a. m. all the larvae looked dead. Opened the jar and transferred the larvae to open vessel with water and found that all the larvae were still alive.

12 m. All the larvae show movements. A few days afterwards some larvae died. Remained only 2 larvae that pupated at 23rd; the imagines hatched at 25th.

III. November 23rd.

Recently boiled water.

1 larva of *Culex fatigans*, 1 of *Stegomyia* and 1 pupa of *Stegomyia*.

Jar closed at 7,50.

Pupa died at 9,30.

Larva of *Culex* died at 10,30 a. m.

Larva of *Stegomyia* died at 12,15 p. m.

IV. November 26th.

2 larvae of *Stegomyia* half grown and 2 larvae of *Limatus* of the same size.

Jar closed at 8,15' p. m.

27th. 12 m. Water renewed. All larvae alive.

28th. 10 p. m. All alive.

29th. Saw a little air bubble, having appeared into the jar during the night. Larvae alive.

V. December 20th.

Aired rain water.

3 larvas de *Stegomyia*: 1 maior e 2 de 2 mm. de comprimento.

Vidro fechado ás 19 h. 45

21 – Todas vivas.

22 – Morta a larva maior.

23 – Vivas as outras 2. Experiencia interrompida; durante a noite apareceu uma bolha de ar.

VI. 25 de Dezembro.

2 larvas de *Stegomyia*, um pequena e uma de 2 dias.

Novo dispositivo (vid. figura 1).

Vidro fechado ás 14 h. 5.

30 – Ambas vivem; a pequena mais desenvolvida,

Janeiro 7 – Indo examinar pela manhã o frasco vimos, no fundo, uma ninfa morta. A outra larva continua viva.

8 – Ainda vive a larva. Experiencia interrompida.

As nossas ultimas experiencias foram realizadas, empregando um dispositivo muito mais simples e mais aperfeiçoado que os anteriores. (vid. fig. 1).

3 larvae of *Stegomyia*: 1 larger and 2 of 2 mm. length.

Jar closed at 7,45 p. m.

21st. All alive.

22nd. Larger larva died.

23rd. 2 larvae alive; a little air bubble having penetrated during the night the experience was interrupted.

VI. December 25th.

2 larvae of Stegomyia, one small the other 2 days old.

New arrangement. (see fig. 1).

Jar closed at 2,5 p. m.

30th. Both larvae alive; the smaller one more grown.

January 7th.

Found in the morning on bottom of jar a dead pupa.

Remaining larva alive.

8th. Still alive. Experience interrupted.

My last experiences were persued using an improved and much simpler arrangement than in former ones. (see fig. 1).
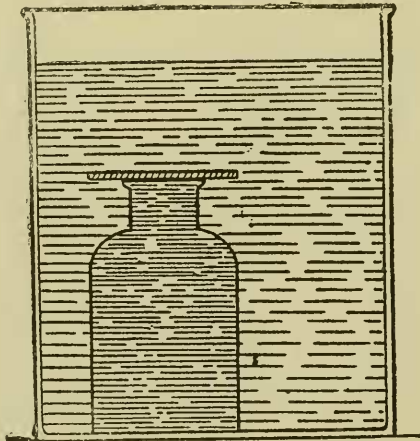
Fig. 1

Empregavamos um frasco transparente, com a capacidade de um litro, o qual enchiamos previamente d'agua limpa e bem arejada. Mergulhavamos esse frasco dentro de um cuba de vidro, tambem cheia de agua limpa e arejada, por meio de uma pipeta in-

I employed a transparent glass flask, holding 1 litre, previously filled up with clean and well ventilated water kept within a large glass jar. By means of a tube I introduced, into the flask, the larvae that I wished to study; this was closed, either with a glass

troduziamos as larvas que queriamos estudar Fechavamos então o frasco ou com uma rolha de vidro, ou com um fragmento de tela metalica muito fina ou com um tampão de algodão ou, finalmente, com uma *placa de vidro.* A agua podia facilmente ser renovada sem ser necessario retirar o frasco da cuba; para isso bastava retirar a placa ou rolha de vidro, introduzir até o fundo do frasco a extremidade dum tubo de vidro, tendo adaptado á outra extremidade um longo tubo de borracha, e proceder a sifonajem; nestas condições, á proporção que a agua saía, era substituida por nova quantidade da agua limpa e arejada que se achava na cuba.

stopper or with cotton wool, wire lid or simply with a glass plate.

The water within the vessel could be easily renewed without removing the vessel from the external jar. For that purpose it was sufficient to remove the glass-plate or stopper and introduce, near the bottom of the vessel, the end of a glass connected with a rubber tube, proceeding the aspiration; the water kept inside the vessel was removed and substituted by a new quantity of clean and aired water coming from the external vessel.
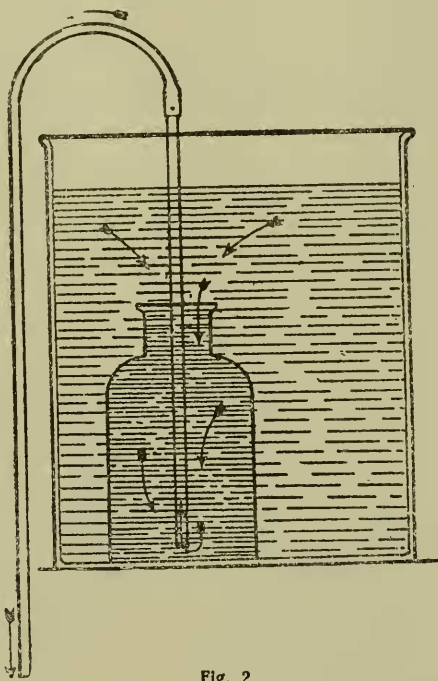
Fig. 2

Depois de feito o renovamento da agua, o frasco era fechado novamente com a tampa de vidro. Durante todo esse tempo as larvas contidas dentro do frasco ficavam sob a nossa vijilancia para evitar que ou passassem para a agua da cuba ou fossem acarretadas, através do tubo, para o exterior.

After renewing, the water was closed with the glass-cover.

While changing the water I observed the larvae inside the vessel, in order to prevent them from escaping either to the water of the externel vessel or through the tube.

VII. 24 de Dezembro – Fechámos o frasco com tela de arame muito fina.
2 larvas de *Stegomyia*: 1 já um tanto desenvolvida e outra menor.
Fechamento do frasco ás 17 h. 25.
25. ás 12 horas vimos que uma das larvas das mais desenvolvidas havia se transformado em ninfa.
Ás 16 h. 40 retirámos o frasco; a ninfa, aparentemente morta, achava-se presa a tela; introduzimos a tela numa bacia com agua.

Nessa ocasião descuidamo-nos das larvas que ficaram no frasco e elas respiraram o ar livre.

A ninfa não estava morta: a 27 dava um individuo macho.

VIII. 20 de Dezembro – 2 larvas de *Stegomyia* introduzidas no frasco grande a 20 de Dezembro ás 19 h. 45.
25. 7 h. todas 2 mortas.

IX. 1 de Janeiro de 1913.
2 larvas: 1 de 2mm. e outra de 3mm.
Fechamento do frasco ás 10,10
16 de Janeiro – vivas. Experiencia interrompida.

Experiencias feitas no Instituto Oswaldo Cruz.

I. 19 de Setembro de 1913.
2 larvas de *Cellia* uma maior e outra menor.
15 h. 30
17 h. 30 – todas 2 vivas.
20 – 20 a grande morta: a larva pequena, conseguindo passar por uma fenda entre a borda do frasco e a placa obturadora, achava-se na agua da cuba de vidro. Introduzimol-a novamente no frasco ás 20 h. 30.
22,30 – viva.
22 20.45 – viva.
23 20 encontrámos bolhas de ar por baixo da placa obturadora que foram retiradas e colocámos novamente a larva.
24 – Viva 8 h.

VII. December 24th.
Vessel closed with a very thin wire net of small meshes; 2 larvae of *Stegomyia*: 1 half grown, the other smaller.
Vessel closed at 5,25 p. m.
25th. At 12 m. the larger larva have pupated.
Vessel removed.
At 4,40 p. m.: pupa looking dead close the wire net; the wire net with pupa was introduced into a basin with water; in that moment I neglected the remaining larvae of the vessel so that they breathed free air.
The pupa was not dead: at 27th hatched a male imago.

VIII. December, 20th.
2 larvae of *Stegomyia* introduced into the large vessel at 7,45 p. m.
25th. All dead.

IX. January Ist, 1913.
2 larvae: one 2 mm. and other 3 mm. in length.
Vessel closed at 10,10 a. m.
16th. All alive. Experience interrupted.

Experiences made in the Institute Oswaldo Cruz.

I. September 19th, 1913.
3,30 p. m. 2 larvae of *Cellia*: one larger and another smaller.
5,30 p. m. Both alive.
20th. 8 a. m. Large larva dead: The small larva get out through a space between the closing plate and the margin of the vessel's mouth.
Introduced again into the vessel at 8,30 a. m.
10,30 p. m. Alive.
22nd. 9,45 p. m. Alive.
23rd. 8 a. m. Bubbles of air found beneath the closing plate; removed 8 a. m.
24th. Alive.

27 – Morta 8 h.

II. 27 de Setembro.

1 larva grande e uma pequena de *Cellia*.

Fechamento do frasco ás 8 h.

29 – Bolhas de ar sob a placa obturadora, que foram retiradas ás 18 h. Vivem ambas.

30 – Renovamento da agua. A larva pequena passou para o exterior, ficou somento a grande.

9,30 Colocámos outra larva pequena de *Cellia*.

16 h. pequenas bolhas de ar sob a placa. Na ocasião de retiral-as a larva grande passou para o exterior; ficou apenas a pequena.

1 de Outubro.

8 h. pequeninas bolhas de ar sob a placa; foram retiradas ás 8,35.

15 h. Pequeninas bolhas de ar; foram retiradas.

6 – A larva pequena conseguiu passar para o exterior através da fenda existente entre a placa e a borda do frasco: introduzida novamente ás 8 h.

7 – A's 8 h. morta.

III. 17 de Outubro.

Larva de *Culex cingulatus*.

Fechamento do frasco ás 16 h. e 30.

19—9 h. Renovamento da agua.

20 – Viva.

22 – Viva; ás 8,30 renovando a agua do frasco, a larva passou para o exterior.

IV. 22 de Outubro.

1 larva grande de *Culex cingulatus* e uma pequena de *Cellia*.

23 – Ambas mortas.

V. 23 de Setembro.

1 larva de *Culex cingulatus* de tamanho medio.

Fechamento do frasco ás 8,10.

24 – Morta ás 8 h.

VI. 24 de Setembro.

1 larva bem desenvolvida e um pequena de *Culex cingulatus*.

27th. 8 a. m. dead.

II. September 27th.

1 large and 1 small larva of *Cellia*.

Vessel closed at 8 a. m.

29th. Bubbles of air beneath the closing plate were removed.

6 p. m. Both alive.

30th. Water renewed The small larva got into the exterior water, the larger one only remaining.

9,30. Another small larva of *Cellia* was introduced.

4 p. m. Little air bubbles beneath the plate. On removing the bubbles the large larva got into the tube and only the small larva remaineel within the vessel.

October 1st. 8 a. m. Little air bubbles beneath the plate, removed at 8,35 a. m.

3 p. m. Little air bubbles, removed.

6th. The little larva escaped through the space remaining between the plate and the mouth of the vessel. Introduced again at 8 a. m.

7th. At 8 a. m. dead.

III. October 17th.

Larva of *Culex cingulatus*.

Vessel closed at 4,30 p. m.

19th. 9 a. m. Water renewed.

20th. Alive.

22nd. Alive; at 8,30 a. m., while renewing water the larva got out by the tube.

IV. October 22th.

1 large larva of *C. cingulatus* and 1 one small of *Cellia*.

23rd. Both dead.

V. September 23th.

1 larva of *C. cingulatus* half grown.

Vessel closed at 8,10 a. m.

24th. 8 a. m. Dead.

VI. September 24th.

1 full grown and 1 small larva of *C. cingulatus*.

17 h. 30 ambas vivas.
25 — Morta a grande.
27 — Viva a larva restante.
29 — Morta ás 8 h.

VII. 29 de Setembro.
1 larva grande e uma pequena de *C. cingulatus.*
Fechamento do frasco ás 8,12.
16 h. 30 ambas vivas.
30 — 8 h. Renovamento da agua; ambas viva; a pequena passou para o exterior.

1 de Outubro.
8,45 Pequeninas bolhas de ar, que foram retiradas.
3 — Viva.
7 — Viva pela manhã ; á tarde morta.

VIII. 29 de Setembro.
1 larva de *C. cingulatus.*
Fechamento do frasco ás 8,24.
30 — Renovamento da agua; viva.
1 de Outubro. Pequeninas bolhas de ar, que foram retiradas.
3 — A' tarde, viva.
6 — Morta.

IX. 30 de Setembro.
3 larvas: duas de *C. cingulatus* (grandes), 1 de *C. fatigans* e uma de *Cellia.*
Fechamento do frasco ás 9,50.
As 16 h. encontrámos bolhas de ar sob a tampa de vidro, que foram retiradas; mortas a larva de *Cellia* e a de *C. fatigans.* 18 h. Vivas as 2 de *C. cingulatus.*
1 de Outubro. Pequeninas bolhas de ar sob a tampa de vidro. Experiencia interrompida.

X. 30 de Setembro.
1 larva de *Cellia.*
Fechamento do frasco ás 8 h.
3 de Outubro morta a larva de *Cellia.*

XI. 30 de Setembro.
3 larvas de *C. cingulatus.*
Fechamento do frasco ás 17 h. 55.
1 de Outubro. Pequenas bolhas de ar sob a tampa ou placa de vidro, que foram retiradas.

5,30 Both alive.
25th. Large larva dead.
27th. Remaining larva alive.
29th. 8 a. m. Dead.

VII. September 29th.
1 large and 1 small larva of *C. cingulatus.*
Vessel closed at 8,12 a. m.
4,30. p. m. Both alive.
30th. 8 a. m. Water renewed; both alive; the small larva escaped.
October 1st. 8,45 a. m. little air bubbles were removed from the vessel.
3nd. Alive.
7th. Alive in morning; dead in the afternoon.

VIII. September 29th.
1 larva of *C. cingulatus.*
Vessel closed at 8,24 a. m.
30th. Alive; water renewed.
October, 1st. Little air bubbles, were removed.
3rd. Afternoon: alive.
6th. Dead.

IX. September 30th.
3 larvae: 2 of *C. cingulatus* (large ones), 1 of *C. fatigans* and 1 of *Cellia.*
Vessel closed at 9,50 a. m.
Found little air bubbles beneath the glass cover at 4 p. m. and removed them; *Cellia* and *C. fatigans* larvae dead.
6 p. m. 2 larvae of *C. cingulatus* alive.
October 1st. Little air bubbles beneath the glass cover. Experience interrupted.

X. September 30 th.
1 larva of *Cellia.*
Vessel closed at 8 a. m.
October 3 rd. Dead.

XI. September 30 th.
3 larvae of *C. Cingulatus.*
Vessel closed at 5.55 p. m.
October 1st. Little air bubbles beneath the plate removed.

3. Vivas as 3 larvas e mais desenvolvidas.
4 – Passou uma para o exterior.
7 – Renovamento da agua á tarde.
8 – 1 morta
11 – Renovamento da agua á tarde.
21 – Morta a outra.

XII. 24 de Setembro.
Frasco contendo agua recentemente fervida.
1 larva de *C. cingulatus* de tamanho medio.
Fechamento do frasco ás 9. 55.
Ao meio dia estava morta.

XIII. 1 de Outubro. Ninfa de *Culex cingulatus.*
Fechamento do frasco ás 8, 55.
10, 0. Morta.

XIV. 6 de Outubro.
1 larva de *C. cingulatus.*
Fechamento do frasco ás 8,50.
7 – Morta.

XV. 2 de Outubro.
2 larvas de *Cellia* pequenas,
1 de *C. fatigans* de tamanho medio e uma de *C. cingulatus.*
Fechamento do frasco ás 8, 30.
3 – morta a larva de *C. fatigans.*
4 – morta a larva de *C. cingulatus.*
6 – morta uma larva de *Cellia.*
9 – morta a outra larva de *Cellia.*

XVI. 3 de Outubro.
1 larva de *Stegomyia.*
Fechamento do frasco ás 16 h. 25.
Renovamento da agua feito de dois em dois dias.
23 – Viva.
24 de Novembro. Morreu a larva de *Stegomyia.*

XVII. 17 de Novembro.
2 laivas de *Gualteria fluviatilis.*
19 – Morta a larva de menor tamanho, a outra viva.
Renovando a agua do frasco a larva de *Gualteria* passou para o exterior. Ainda vivia perfeitamente.

3rd. All larvae alive and grown.
4th. 1 larva got out by the tube.
7th. Water renewed in the afternoon.
8th. 1 dead.
11th. Water renewed in the afternoon.
21th. Remaining larva dead.

XII. September 24 th. *Vessel containing recently boiled water*, closed at 9. 55 a. m.
1 larva of *C. cingulatus* half grown.
12 n. Dead.

XIII. October Ist. Pupa of *C. cingulatus.*
Vessel closed at 8.55.
10,30 a. m. Dead.

XIV. October 6 th.
Larva of *C. cingulatus.*
Vessel closed at 8. 0 a. m.
7 p. m. dead.

XV. October 2 nd.
2 small larvae of *Cellia*, 1 of *C. fatigans* half grown and 1 of *C. cingulatus.*
Vessel closed at 8.30 a. m.
3rd. Larva of *C. fatigans* dead.
4th. Larva of *C. cingulatus* dead.
6th. 1 larva of *Cellia* dead.
9th. Another larva of *Cellia* dead.

XVI. October 3 rd.
1 larva of *Stegomyia.*
Vessel closed at 4.25 p. m.
Water renewed every 2 nd day.
23rd. Alive.
November 24 th. Larva of *Stegomyia* died.

XVII. November 17 th.
2 lavae of *Gualteria fluviatilis.*
19th. smaller larva dead; the other alive.
Renewing the of the vessel water *Gualteria* larva still alive got out through the tube.

XVIII. 1 de Dezembro.

Dum antigo fóco de larvas de *Gualteria fluviatillis* retirámos 2 larvas (uma grande e uma pequena) e colocámos no frasco de experiencias.

Introduzimos tambem uma larva de *Stegomyia* de tamanho medio.

Fechamento do frasco ás 21, 30.

3 de Dezembro. Todas vivas. Introduzimos mais 2 larvas de *Stegomyia* de tamanho medio, sendo uma perfeita e uma sem os foliolos branquiais que haviamos retirado horas antes.

10. Todas vivas.

Experiencia interrompida.

Experiencas feitas para estudar a ação do petroleo sobre as larvas e ninfas de culicideos.

I. 1 ninfa de *Stegomyia* num bocal de vidro com agua.

Petroleo derramado ás 11,55.

Morta ás 12,8

II. Bocal de vidro, contendo larvas e ninfas de *Stegomyia*.

Petroleo derramado ás 12,22.

5 larvas que ficaram na superficie, em contato com o petroleo, morreram ás 12, 30. Ninfas mortas ás 12, 55. 1, 10 todas as larvas restantes mortas.

III. 2 Bocais de vidro, cada um com 2 larvas de *Culex* (1 grande e uma pequena). Petroleo derramado em ambos ás 12, 42. Num frasco o petroleo foi misturado com a agua por meio da ajitação e no outro foi apenas derramado na superficie.

Bocal em que o petroleo foi ajitado: ás 13 h, ambas as larvas mortas.

Bocal em que o petroleo não foi ajitado: ás 13,20 retirámos 3 larvas ainda vivas que foram colocadas em uma cuba, contendo agua sem petroleo.

Ás 14 h. morta a larva grande.

Ás 14,15 morta a larva pequena.

XVIII. December Ist.

From an old breading place of *Gualterteria fluviatilis* 2 larvae were removed (1 large and 1 small one) and transfered to the jar for experiencies; 1 larva half grown of *Stegomyia* was also introduced. Vessel closed at 9.30 p. m.

December 3 rd. All alive. 2 half grown larvae of *Stegomyia*, one without leaflets, were introduced.

10th. All alive.

Experience interrupted.

Experiences made in order to study the action of kerosene oil (petroleum) on culicid larvae and papae.

I. 1 pupa of *Stegomyia* in a glass jar full of water.

Kerosene spread on water at 11.55 a. m.
Dead at 12.8 p. m.

II. Glass jar containing larvae and pupae of *Stegomyia*.

Kerosene spread on the surface of water at 12.22 p. m.

5 larvae that stayed on water surface, close to the kerosene layer, died at 12.30 p. m. Pupae dead at 12.55 p. m. At 1.10 p. m. remaining larvae dead.

III. 2 glass jars each with 2 larvae of *Culex*. (1 large and 1 small one). Kerosene spread in both jars at 12.42 p. m. In one jar the kerosene was mixed with the water by stirring.

Jar where the kerosene was mixed with water: at 1.10 p. m. both larvae dead.

Jar where the kerosene was not mixed: at 1.20 p. m dead.

3 larvae were removed still alive and transferred to a vat containing water without kerosene.

At 2 p. m. large larva dead.

At 2.15 p. m. small larva dead.

IV. 2 Bacias contendo agua. Em cada uma foram colocadas 3 larvas de *Stegomyia*.

Numa derramámos petroleo e ajitámos o liquido, ás 22,10

Noutra derramámos o petroleo de modo a formar uma tenue camada sobre a agua ás 22,16.

Ás 22,45 mortas todas as larvas da primeira bacia.

Ás 23,5 mortas todas as larvas da segunda bacia.

V. 24 de Setembro.

Tubo de vidro com agua e contendo 3 larvas: 1 de *Cellia*, pequena, 1 de *Culex cingulatus*, pequena e outra de *C. cingulatus*, grande.

Petroleo derramado ás 9,1

Ás 9,15 todas 3 no fundo, apresentando movimentos convulsivos.

Das 9,20 em diante não voltaram mais á superficie.

Ás 9,25 a larva de *Cellia* morta.

Ás 9,40 a. m. a larva pequena de *Celli* morta.

Ás 10,30 a larva grande apresenta movimentos.

Ás 11 h. morta.

Conclusões.

Pelos resultados das experiencias que fizemos podemos concluir que as larvas dos culicideos, se normalmente respiram *principalmente* o ar livre por intermedio das 2 traquéas do sifão respiratorio, respiram tambem o oxijenio do ar dissolvido n'agua, realizando-se as trocas gazosas ao nivel dos foliolos branquiais e do tegumento do corpo da larva.

Dum modo geral, pode-se dizer que quanto menor for a larva, tanto mais facilmente ela se acostumará á viver sem respirar o ar livre e, portanto, mais tempo viverá unicamente á custa do ar dissolvido n'agua. As larvas muito desenvolvidas, que já estão prestes a se transformar em ninfas, via de regra, morrem em menos de um dia, quando se as impede de respirar o ar livre.

IV. 2 basins with water, each one with 3 larvae of *Stegomyia*.

In one the kerosene was spread and stirred with the water at 10.10 p. m: in the other without stirring at 10.16 p. m.

At 10.45 p. m. all larvae of the Ist basin dead.

At 10.5 p. m. all larvae of the 2 nd basin dead.

V. September, 24 th.

Test tube containing water and 3 larvae: 1 small larva of *Cellia*, 1 small larva of *Culex cingulatus* and 1 large larva of *C. cingulatus*; kerosene spread at 9.1 a. m.

At 9.15 all larvae on the bottom of the tube show convulsive movements.

From 9.20 a. m. the larvae did not return to the surface of water.

At. 9.25. a. m. *Cellia* larva dead.

At. 9.40. a. m. Small *Culex* larva dead.

At. 10.30. a. m. Large larva still with some movements.

At. 11 a. m. Dead.

Conclusions.

The results on my experiments convinced me that mosquito larvae, while generally breathing mainly free air by the two tracheae of the respiratory syphon, also respire the oxygene of the air dissolved in water, the gazeous exchanges being made by the branchial leaflets and also the general integument of the body.

As a rule we may say that the younger the more easily it will get in the habit of living, without the help of the external air, only by the air dissolved in the water. Very advanced larvae ready to change in the nymphal state will die as a rule in less than a day.

Small larvae, having enough food in the vessel used for the experiment, grow and may even become nymphae; these however die fatally after a short time not being able to breathe the air dissolved in the water.

As larvas pequenas, havendo no frasco de experiencia alimento suficiente, desenvolvem-se e podem mesmo transformar-se em ninfas, as quais fatalmente morrerão no fim de pouco tempo porque não podem respirar o ar dissolvido n'agua.

Os foliolos branquiais absolutamente nada contribuem para a locomoção que se faz na larva. A larva privada deles vive tão bem como quando os possuia. Os foliolos branquiais são organs puramente respiratorios. As larvas que os possuem com ramificação traqueal abundante, em normais condições de existencia, passam muito tempo debaixo d'agua, e, si, por um dispositivo (v. nossas experiencias) as privarmos totalmente de respirar o ar livre, elas continuam e viver perfeitamente durante muito tempo.

As larvas, cujos foliolos possuem apenas um ramo traqueal axial com pequenas ramificações laterais estão quasi sempre na superficie da agua e quando vão ao fundo pouco tempo ai se demoram: quando são totalmente privadas de respirar o ar, *pelo nosso dispositivo,* suportam dificilmente esse novo modo de viver e, ás vezes, morrem no fim dum dia.

Para viver a larva unicamente á custa do ar dissolvido n'agua, é necessario renovar frequentemente a agua, isto é, preciso é que a larva esteja mergulhada em agua muito arejada.

Fazendo-se a ablação dos foliolos branquiais em uma larva que habitualmente fica muito tempo sem vir á tona d'agua para respirar o ar exterior, verifica-se que ela então procura vir á tona d'agua com mais frequencia.

Larvas de Stegomyia sem os foliolos branquiais, transportadas para o frasco de experiencias e isoladas do ar exterior, mantêm-se vivas durante tempo mais ou menos longo.

Qualquer larva que for transportada para o frasco de experiencias, contendo agua recentemente fervida ou que desprenda gazes nocivos a respiração, morre no fim de poucas horas.

O petroleo mata as larvas, não só porque as priva *totalmente* de respirar, como porque as intoxica. Se as larvas morrem asfixiadas o fato não é sómente por privação do ar livre e sim tambem porque, aderindo o petroleo ao tegumento externo do corpo da larva e aos foliolos, impede a respiração do

The branchial leaflets are of no value for the purpose of locomotion which is as perfect in the larva deprived of them as before. They are only used for respiration and the larvae in which they show numerous tracheal ramifications do normally remain a long time under the water. If by some arrangement, as in my experiences they are altogether prevented to breathe free air, they live perfectly well for a long time.

The larvae with leaflets, showing only an axial tube with small ramifications, stays mostly on the surface and when going down do not remain long time at the bottom; when prevented by, our arangement for experiencees, to breathe free air, they do not bear this mode of living well and sometimes die at the end of one dah.

If the larvae have to live only on the air dissolved in the water, this has to be frequently renewed, because they can only live in well aerated air.

Removing the branchial leaflets of larvae, which generallh remain a long time without coming to the surface for breathing the external air, we shall see them rise to the surface more frequentlh.

Stegomyia larvae, deprived of their leaflets and shut of from the external air in my jar for experiments, remain alive for a more or less long time.

Any larva shut up in the experimental jar with water either boiled or containing gazes unfit for respiration, dies in a few hours.

The larvae die under petroleum film not onlh bh absolut want of air for respiration but also because they are intoxicated.

If the larvae dies asphixiated that is not due to the deprivation of free air but also by the inhibition of cutaneous respiration by the petroleum adhering.

ar dissolvido n'agua. Provavelmente morrem por intoxicação. Quando se derrama petroleo sobre a agua de um bocal, contendo larvas de culicideos, verifica-se sempre que elas, vindo á tona d'agua e encontrando nesta a camada de petroleo, no fim de pouco tempo decem; no momento da decida, talvez por sentir o sifão respiratorio obliterado pelo petroleo, que penetrou por capilaridade, procura retiral-o com a boca e provavelmente injere quantidade suficiente para determinar-lhe a morte. É possivel, tambem, que a intoxicação se realize pela injestão de agua, contendo petroleo nela emulsionado.

Manguinhos, Dezembro 1913.

In most cases, when petroleum is poured on the water of a jar containing mosquito larvae; they die by intoxication when they rise to breathe and come in contact with the petroleum it enters their respiratory syphon and the larva may be seen trying to brush it off with their mouth parts, which help still more to poison them.

Also small quantities of dissolved petroleum components might be absorbed with the water itself.

Manguinhos, December 1913.

Estampa 4.

Explicação das figuras.

Foliolos anaes de larvas de mosquitos.
1. Stegomyia calopus.
2. Stegomyia calopus.
3. Dendromyia sp.
4. Uranotaenia pulcherrima.
5. Culex bilineatus. (?)
6. Culex sp.
7. Culex fatigans.
8. Limatus Durhami.
9. Limatus Durhami.

Plate 4.

Explanation of figures.

Anal leaflets of mosquito larvae.
1. Stegomyia calopus.
2. Stegomyia calopus.
3. Dendromyia sp.
4. Uranotaenia pulcherrima.
5. Culex bilineatus (?)
6. Culex sp.
7. Culex fatigans.
8. Limatus Durhami.
9. Limatus Durhami.